



**Méthodes alternatives d'analyse pour l'agroalimentaire  
Performances analytiques certifiées**

**ATTESTATION DE VALIDATION\* DE METHODE ALTERNATIVE D'ANALYSE**

*\*selon le protocole défini par le bureau technique AFNOR VALIDATION  
et applicable aux méthodes de détection des résidus d'antibiotiques et  
autres molécules à effet apparenté*

N° attestation : DSM 28/1 – 06/06

Date de validation : 30.08.2006

Fin de validité : 30.08.2010

**La Société**      **DSM Premitest**  
(Distributeur)    Postbox 1163  
6160 BD Geleen  
Pays-Bas

**Fabricant**      **DSM Food Specialties**  
**Et site de**      **Postbox 1**  
**production**    2600 MA Delft  
Pays -Bas

est autorisée à faire référence à la marque **AFNOR VALIDATION** pour la méthode alternative d'analyse ci-dessous :

Référence de la méthode :

**PREMI®TEST**

**Test rapide de détection de résidus d'antibiotiques dans le muscle**

Référence du protocole : Notice **0609**

**DOMAINE D'APPLICATION** : viande (porcine, bovine et volaille)

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI** : aucune

**METHODE DE REFERENCE**

Méthode des quatre boîtes LMV/90/01

**Le Directeur Général Délégué  
Jacques BESLIN**

**AFAQ AFNOR Certification**

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France  
Bureaux : 116, avenue Aristide Briand – BP 40 – 92224 Bagneux Cedex 6 – France  
Tél +33 (0)1 46 11 37 00 – Fax +33 (0)1 46 11 39 40  
[certification@afaq.afnor.org](mailto:certification@afaq.afnor.org) - [www.afnor.fr](http://www.afnor.fr)

## PRINCIPE DE LA METHODE

Le test Premi®Test est une méthode à large spectre qui permet de détecter des substances antimicrobiennes présentes dans la viande. Le principe est basé sur l'inhibition de la croissance du *Bacillus stearothermophilus*, bactérie très sensible aux antibiotiques et aux sulfamides. Des spores standardisées sont incluses dans de la gélose additionnée de nutriments sélectionnés.

Le Premi®Test est appliqué sur du jus de viande déposé dans des tubes contenant la gélose au sein de laquelle se trouvent les spores de *Bacillus stearothermophilus*. Après 20 minutes de diffusion puis élimination du jus, le tube est incubé pendant 3 heures à 64°C, puis la couleur est vérifiée.

En cas de changement de couleur (apparition de bactéries qui entraînent l'acidification du milieu), le test est négatif. A l'inverse, en présence d'antibiotique, il n'y a pas de bactérie et la couleur du test ne change pas.

Les échantillons positifs doivent être confirmés par une méthode physico-chimique pour identification et quantification.

## NOTE

Il convient de préciser que la méthode alternative Premi®Test et la méthode officielle dite des 4 boîtes, prise en référence, sont basées sur des principes différents : la méthode Premi®Test permet de détecter un grand nombre d'antibiotiques couramment utilisés pour la viande avec un germe unique, alors que la méthode de référence détecte les résidus des substances à activité antibiotique à l'aide de 4 germes (tous différents de celui du Premi®Test). De plus, la méthode des 4 Boîtes est basée sur l'analyse de rondelles de muscle congelé, alors que le Premi®Test est basé sur l'analyse de jus de viande. Ces deux méthodes ne peuvent donc pas être équivalentes, ce qui explique les données obtenues au chapitre justesse.

## PRATICABILITE

- Les résultats (positifs ou négatifs) sont obtenus en 4 à 5 heures avec le test Premi®Test contre 24 heures avec la méthode de référence.

## LIMITE DE DETECTION

- Des essais ont été effectués avec le Premi®Test uniquement, sur des jus de viande de porc contenant des antibiotiques. Six antibiotiques ont été testés, à 3 niveaux de concentration chacun. Les concentrations testées étaient proches des LMR. Cinq aliquots ont été testés par antibiotique et par concentration, soit 90 échantillons au total.
- Des jus de porc blancs (témoins négatifs) ont également été testés en double aveugle, soit 40 analyses.

Les limites de détection figurent dans le tableau suivant :

Famille	Sulfamide	Tetracycline	Macrolide	Beta-lactamine	Aminoside	Beta-lactamine	Global
Antibiotique	Sulfadime-razine	Oxytetracy-cline	Tylosine	Amoxycilline	Genta-mycine	ceftiofur	
LMR muscle (µg/kg)	100	100	100	50	50	1000	-
Concentrations testées (µg/kg)	50/100/200	50/100/200	50/100/200	25/50/100	50/100/200	100/200/400	-
Taux de détection à 50% LMR	0%	60%	80%	100%	0%	-	48%
Taux de détection à la LMR	20%	80%	100%	100%	0%	100%	67%
Taux de détection à 2 fois la LMR	100%	100%	100%	100%	40%	100%	90%

LMR : Limite Maximale en Résidus

La limite de détection est au niveau de la LMR pour 3 antibiotiques (tylosine, amoxicilline, ceftiofur), et à 2 X LMR pour 2 autres antibiotiques (sulfadimérazine et oxytétracycline).  
Pour la gentamycine, la limite de détection est supérieure à la LMR (40% de positifs à 2 x LMR).

Echantillons blancs (n = 2 x 20 = 40) :

Répétitions	Blanc 1	Blanc 2	Blanc 3	Blanc 4	Blanc 5	Blanc 6	Blanc 7
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	D+	-	-	D+	-	-
Répétitions	Blanc 8	Blanc 9	Blanc 10	Blanc 11	Blanc 12	Blanc 13	Blanc 14
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	D+	-	-	-
Répétitions	Blanc 15	Blanc 16	Blanc 17	Blanc 18	Blanc 19	Blanc 20	
1	-	D+	-	-	-	-	
2	-	+	D+	-	-	-	

## TAUX DE FAUX-POSITIFS ET DE FAUX-NEGATIFS :

Le taux de faux-négatifs du Premi®Test a toujours été inférieur à celui de la méthode des 4 Boîtes. C'est ce taux qui doit être minimal pour une méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques. A l'inverse le taux de faux-positifs du Premi®Test s'est révélé, dans la phase ultime\* de l'étude plus élevé que celui de la méthode des 4 Boîtes. Ceci ne remet pas en cause les performances de la méthode puisque les échantillons positifs doivent être confirmés par une méthode physico-chimique pour identification et quantification.

\* les résultats relatifs à la phase 3 de l'étude sont disponibles dans le rapport de synthèse.

## ETUDE COMPARATIVE

Comparaison des performances de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 2006 sur des échantillons (porcs) naturellement chargés en antibiotiques. Cinq morceaux de muscle de porc ont été analysés par la méthode de référence et la méthode Premi®Test, pour 3 antibiotiques chacun (oxytétracycline/sulfadiméthoxine, tylosine, amoxicilline) à une concentration.

Le tableau suivant indique les résultats obtenus en comparant le Premi®Test à la méthode de référence :

		Méthode de référence			
		Réponse	R+	R-	Total
Méthode alternative	A+		11	4	15
	A-		2	3	5
	Total		13	7	20

Selon la norme EN ISO 16140, les calculs suivants ont été réalisés :

- Exactitude relative : AC = 70%
- Spécificité relative : SP = 42,9%
- Sensibilité relative : SE = 84,6%

**Remarque :** dans le cadre de ce protocole, la valeur de AC = 70% entre le Premi®Test et la méthode des quatre boîtes est la conséquence des résultats faux négatifs et faux positifs de la méthode des quatre boîtes, et non d'un problème de sensibilité ou de spécificité du Premi®Test.

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 11 laboratoires. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons provenant de 4 matrices différentes, chacune avec 4 concentrations en antibiotiques.

Les laboratoires ont testé, en double, un échantillon pour chaque niveau de contamination, soit 32 échantillons par laboratoire. Les laboratoires ont réalisé deux séries d'analyses. Seule la méthode Premi@Test a été testée

En sus de ces échantillons, les laboratoires ont testé un échantillon témoin négatif par matrice et un échantillon positif supplémenté avec de la pénicilline G à 10 µg/kg.

Les résultats par couple matrice/antibiotique et par niveau de contamination sont les suivants :

Matrice/ antibiotique Niveaux (µg/kg)	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons analysés*	Nombre de résultats négatifs	Nombre de résultats positifs	% échantillons positifs
Porc/Oxytetracycline 0	22	18	36	0	0%
Porc/Oxytetracycline 20	22	18	36	0	0%
Porc/Oxytetracycline 200	22	18	32	4	11%
Porc/Oxytetracycline 400	22	18	11	25	69%
Boeuf/Sulfadimerazine 0	22	18	32	4	11%
Boeuf/Sulfadimerazine 20	22	18	33	3	8%
Boeuf/Sulfadimerazine 200	22	18	30	6	17%
Boeuf/Sulfadimerazine 400	22	18	17	19	53%
Porc/Ceftiofur 0	22	18	30	6	17%
Porc/Ceftiofur 40	22	18	34	2	6%
Porc/Ceftiofur 400	22	18	32	4	11%
Porc/Ceftiofur 800	22	18	0	36	100%
Poulet/Tylosine 0	22	18	36	0	0%
Poulet/Tylosine 10	22	18	36	0	0%
Poulet/Tylosine 100	22	18	6	30	83%
Poulet/Tylosine 200	22	18	0	36	100%
<b>Total</b>	<b>352</b>	<b>288</b>	<b>401</b>	<b>175</b>	<b>-</b>

\* Un laboratoire a été éliminé de l'analyse en raison d'un délai de transport trop long, d'échantillons décongelés et du témoin négatif poulet détecté positif sur les deux séries d'analyses.

\* Un autre laboratoire a été éliminé en raison d'un témoin négatif poulet détecté positif à la première série d'analyses.

Pour rappel, les limites maximales en résidus (LMR) pour chacun des antibiotiques testés sont les suivantes :

Oxytetracycline :	LMR = 100 µg/kg
Sulfadimerazine :	LMR = 100 µg/kg
Ceftiofur	LMR = 1000 µg/kg
Tylosine	LMR = 100 µg/kg

### **Conclusion**

Les limites de détection à 50% ont été déterminées à partir des valeurs de l'étude interlaboratoire, pour chaque couple matrice/antibiotique. Les valeurs sont exprimées sous forme de fourchettes, la première valeur correspondant aux résultats du laboratoire expert et la deuxième aux résultats de l'étude interlaboratoire :

Porc/Oxytetracycline :	200 – 400 µg/kg	Boeuf/Sulfadimerazine :	200 – 400 µg/kg
Porc/Ceftiofur :	400 – 600 µg/kg	Poulet/Tylosine :	50 – 100 µg/kg

### **Conclusion générale**

Les études préliminaire et collaborative ont donné des résultats concordants en terme de niveau de détection.

Le taux de faux-négatifs du Premi®Test a toujours été inférieur à celui de la méthode des 4 Boites (ce taux devant être minimal pour une méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques)

Il est souhaitable d'adresser à AFAQ AFNOR Certification  
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

AFAQ AFNOR Certification tient à votre disposition  
un document de synthèse des études préliminaire et collaborative